

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 6713Star9974	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 03830	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/04/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 04/05/1999
Anmelder BEIERSDORF AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K9/70 A61K47/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 250 267 A (HARTDEGEN FRANK J ET AL) 10. Februar 1981 (1981-02-10) Spalte 3, Zeile 64 - Spalte 4, Zeile 28 Spalte 30, Zeile 30 - Zeile 46; Beispiel 22 ---	1-9
A	US 4 098 645 A (HARTDEGEN FRANK JOSEPH ET AL) 4. Juli 1978 (1978-07-04) Anspruch 1 ---	1-9
A	US 5 134 072 A (EICKEN ULRICH ET AL) 28. Juli 1992 (1992-07-28) Spalte 1, Zeile 53 - Zeile 68 Ansprüche 1-13 --- -/--	1-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, S



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 08 445 A (BEIERSDORF AG) 22. September 1994 (1994-09-22) Seite 2, Zeile 3 - Zeile 5 Anspruch 1 -----	1-9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/03830

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4250267	A	10-02-1981	NONE	
US 4098645	A	04-07-1978	AT 347028 B	11-12-1978
			AT 280376 A	15-04-1978
			CA 1076027 A	22-04-1980
			CH 639673 A	30-11-1983
			DE 2612138 A	30-12-1976
			FR 2314194 A	07-01-1977
			GB 1541100 A	21-02-1979
			JP 1243714 C	14-12-1984
			JP 51150600 A	24-12-1976
			JP 59017733 B	23-04-1984
			MX 4074 E	02-12-1981
			NL 7603951 A	14-12-1976
US 5134072	A	28-07-1992	DE 3705687 A	01-09-1988
			AT 63945 T	15-06-1991
			DE 3862949 D	04-07-1991
			EP 0280212 A	31-08-1988
			GR 3002028 T	30-12-1992
			JP 1670182 C	12-06-1992
			JP 3036511 B	31-05-1991
			JP 63226283 A	20-09-1988
DE 4308445	A	22-09-1994	AU 692424 B	11-06-1998
			AU 4820193 A	26-04-1994
			DE 59309311 D	25-02-1999
			WO 9407935 A	14-04-1994
			EP 0665856 A	09-08-1995
			ES 2129082 T	01-06-1999
			JP 8501819 T	27-02-1996
			US 5844013 A	01-12-1998



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 20 FEB 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 6713Star9974	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/03830	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/04/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 04/05/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K9/70		
Anmelder BEIERSDORF AG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 27/04/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 16.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Giménez Miralles, J Tel. Nr. +49 89 2399 8655 



I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-9 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/03830

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Zu Punkt V

- 1) Der Gegenstand der vorliegenden Ansprüche 1-9 gilt als neu (Artikel 33(2) PCT), denn kein der im Recherchenbericht zitierten Dokumenten nimmt ein Verfahren zur Immobilisierung eines Biomoleküls an der Oberfläche oder an oberflächennahen Schichten einer Polyurethanmatrix vorweg, wobei die Polyurethanmatrix-Oberfläche unter den im Anspruch 1 oder Anspruch 5 angegebenen Bedingungen aktiviert wird, so daß die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt.
- 2) Der Gegenstand der vorliegenden unabhängigen Ansprüche 1, 5 und 7 beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

Der Erfindung liegt die technische Aufgabe zugrunde, ein in Anbetracht des Standes der Technik verbessertes Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen an der Oberfläche oder an oberflächennahen Schichten einer Polyurethanmatrix zur Verfügung zu stellen, in dem die Polyurethanmatrix nicht oder nur schwach quillt.

Die Lösung erfolgt durch entweder i) Aktivierung der Polyurethanmatrix-Oberfläche mit einem Aktivierungsreagenz in organischer Lösung, die zumindest 80% unpolare Lösungsmittel enthält (Anspruch 1); oder ii) Aktivierung der Polyurethanmatrix-Oberfläche in wäßriger Lösung, wobei der Aktivierungsreagenz TCDI ist (Anspruch 5). Beide Alternativen stellen entsprechende technische Merkmale dar, die den selben technischen Effekt gewährleisten.

Kein der im Recherchenbericht zitierten Dokumenten bezieht sich auf die Immobilisierung von Biomolekülen durch Oberfläche-Behandlung einer Polyurethanmatrix. Somit ist die vorliegende Erfindung als nicht offensichtlich bzw. nicht aus dem Stand der Technik herleitbar zu betrachten. Die selben Schlußfolgerungen gelten für die abhängigen Ansprüche 2-4, 6, 8 und 9, die sich auf besondere Ausführungsarten der Erfindung beziehen.



Zu Punkt VIII

Das auf Seite 10, Z.4-6 und in Beispiele 3 und 7 beschriebene Ausführungsbeispiel der Erfindung (Kopplung über Spacermoleküle) läßt sich nicht den vorliegenden Ansprüchen unterordnen. Dieser Widerspruch zwischen den Ansprüchen und der Beschreibung führt zu Zweifeln bezüglich des Gegenstandes des Schutzbegehrens (siehe Richtlinien PCT III-4.3), weshalb die Ansprüche nicht klar sind (Artikel 6 PCT).



•
•
•
•

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference 6713Star9974	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/03830	International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00)	Priority date (day/month/year) 04 May 1999 (04.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/70		
Applicant BEIERSDORF AG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u> </u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 27 April 2000 (27.04.2000)	Date of completion of this report 16 February 2001 (16.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03830

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-16 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-9 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/03830

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The subject of present Claims 1-9 is regarded as novel (PCT Article 33(2)), since none of the documents cited in the search report anticipates a method of immobilising a biomolecule on the surface or in layers close to the surface of a polyurethane matrix, the polyurethane matrix surface being activated under the conditions stated in Claim 1 or Claim 5 so that the polyurethane matrix does not swell or swells only a little.

2. The subject of present independent Claims 1, 5 and 7 is founded on an inventive step (PCT Article 33(3)).

The technical problem addressed by the invention is to provide a better method than the prior art for immobilising biomolecules on the surface or in layers close to the surface of a polyurethane matrix, wherein the polyurethane matrix does not swell or swells only a little.

The problem is solved either i) by activating the polyurethane matrix surface with an activating



reagent in an organic solution containing at least 80% covalent solvent (Claim 1); or ii) by activating the polyurethane matrix surface in an aqueous solution, the activating reagent being TCDI (Claim 5). The two alternatives represent corresponding technical features which achieve the same technical effect.

None of the documents cited in the search report concerns the immobilisation of biomolecules by surface treatment of a polyurethane matrix. The present invention must therefore be regarded as not obvious and not inferrable from the prior art. The same conclusions apply to dependent Claims 2-4, 6, 8 and 9, which relate to special embodiments of the invention.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. _____
PCT/EP 00/03830

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The embodiment of the invention described on page 10, lines 4-6, and in Examples 3 and 7 (coupling by way of spacer molecules) falls outside the present claims. This inconsistency between claims and description causes doubt as to the subject matter for which protection is sought (see PCT Guidelines PCT/GL III, 4.3), and for this reason the claims are not clear (PCT Article 6).

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 9/70, 47/34	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/66092 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03830 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. April 2000 (27.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 20 262.1 4. Mai 1999 (04.05.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEIERSDORF AG [DE/DE]; Unnastrasse 48, D-20245 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ETTNER, Norbert [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 21, D-86551 Aichach (DE). MAHLER, Thomas [DE/DE]; Rollplatz 3B, D-38678 Clausthal-Zellerfeld (DE). SCHAUMANN, Ernst [DE/DE]; Kurt-Kühler-Strasse 39, D-22609 Hamburg (DE). SCHINK, Michael [DE/DE]; Falckweg 3, D-22605 Hamburg (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BEIERSDORF AG; Unnastrasse 48, D-20245 Hamburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A POLYURETHANE MATRIX WITH COVALENTLY IMMOBILISED BIOMOLECULES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER POLYURETHANMATRIX MIT KOVALENT IMMOBILISIERTEN BIOMOLEKÜLEN (57) Abstract <p>According to the inventive method for producing a polyurethane matrix with covalently immobilised biomolecules, the polyurethane matrix is presented in a solvent mixture containing an at least 80 % non polar solvent in which the polyurethane matrix does not swell or swells only slightly and in which the activating reagent is contained, so that the subsequent immobilisation of the biomolecule preferably takes place on the surface of the polyurethane matrix or on layers near to the surface.</p> (57) Zusammenfassung <p>Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen, wobei die Polyurethanmatrix in einem Lösungsmittelgemisch vorgelegt wird, wobei das Lösungsmittelgemisch zumindest zu 80 % unpolare Lösungsmittel enthält, in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz befindet, so dass die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

Beschreibung

Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Polyurethan-Wundauflagen, an die wundheilungsrelevante Biomoleküle wie zum Beispiel Superoxid-Dismutase immobilisiert sind, mit denen es möglich ist, den normalen Heilungsprozeß einzuleiten beziehungsweise zu fördern. Durch eine temporäre und lokal begrenzte Applikation der wundheilungsfördernden Enzyme werden fehlende oder nicht ausreichend vorhandene Faktoren ausgeglichen und ergänzt.

- 20 Die Aktivierung der funktionellen Gruppen zur kovalenten Kopplung von Proteinen, Antikörpern und Enzymen oder niedermolekularen organischen Substanzen über Aminogruppen sind in Standardwerken wie zum Beispiel W. H. Scouten, Immobilized Enzymes and Cells, in Methods Enzymol., Ed. K. Mosbach, 1987; 135:30 und in Immobilization of Enzymes and Cells, 1997; Ed. G. F. Bickerstaff, Humana Press, Totowa, New Jersey;
- 25 H.A. Staab, H. Bauer, K.M. Schneider in Azolides in Organic Synthesis and Biochemistry, Wiley-VCH, 1998 ausführlich beschrieben. Als funktionelle Aminogruppen bei Proteinen, Antikörpern und Enzymen können die α -Aminogruppen des Aminoterminus und die ω -Aminogruppen der oberflächenexponierten Aminosäureseitenketten von Lysin und Arginin fungieren. Zur Aktivierung können aber auch andere Reagenzien wie beispielsweise Carbonylditriazol (CDT) (vergleiche C. Delgado et al. 1992, Critical Reviews in
- 30 Therapeutic Drug Carrier Systems, 9, 249) verwendet werden.

Entsprechende Kopplungsverfahren sind als Stand der Technik bekannt und werden zum Beispiel bei der Herstellung von Stoffen für präparative und analytische Anwen-

dungen eingesetzt. So ist beispielsweise in der EP 0 087 786 ein Verfahren zur Immobilisierung des Eisen-Chelators Desferrioxamin über Bindung der primären Aminogruppe beschrieben, wobei DFO an Agarose-Polyaldehyd-Gelperlen gebunden wird.

Die kovalente Modifizierung von SOD (P. Pyatak et al., 1980, Res. Com. Chem. Path. and Pharmacol., 29, 115), Katalase (A. Abukovski et al., 1976, J. Biol. Chem., 252, 3582) und anderen Enzymen (M. L. Nucci et al., 1991, Advanced Drug Delivery Reviews, 6, 133) mit Polyethylenglykol durch Kopplung von aktiviertem Polyethylenglykol an Aminogruppen der Enzyme ist offenbart.

Hirano et al. (1994, J. Controlled Release, 28, 203) beschreibt die Herstellung von SOD-Polymerkonjugaten mit aktiviertem Divinylether und Maleionsäureanhydrid. Fortier beschreibt in der WO 95/15352 die kovalente Einbindung von Peroxidase und Katalase über Aminogruppen in ein Polymergel bestehend aus dem Protein BSA und voraktiviertem Polyethylenglykol. Maneke und Polakowski (1981, J. Chrom, 215, 13) beschreiben die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an eine Polymermatrix aus Polyvinylalkohol und Terephthalaldehyd.

In der WO 98/02189 wird eine Methode zur Kopplung von wundheilungsrelevanten Enzymen oder Proteinen an Polyhydroxypolymere wie beispielsweise Cellulose beschrieben. Dabei wird das Aufquellen eines Polyhydroxypolymers in organischen Lösungsmitteln beansprucht.

Polyurethane zählen ebenfalls zu den Polyhydroxyverbindungen, haben aber beispielsweise gegenüber Cellulose den Nachteil, daß sie unter den bekannten Bedingungen zur Aktivierung der Hydroxygruppen stark quellen.

In WO 96/31551 werden im trockenen Zustand Proteine oder Peptide als aktive Agenten zu Polyurethan-vernetzten Microgelen gemischt. Die Microgele quellen im wäßrigen Medium zu Hydrogelen auf und setzen aus der Hydrogelmatrix das Protein beziehungsweise das Peptid wieder frei. Auch US 5,000,955 beschreibt Polyurethan-Hydrogele für kosmetische, biologische und medizinische Anwendungen. Kubische Phasen bestehend aus Glycerylmonooleat können Enzyme durch nicht-kovalente Bindungen, wie in WO 96/39125 berichtet, immobilisieren. Dabei bleibt durch die Immobilisierung die enzymatische Aktivität erhalten und ist sogar, im Vergleich zu gelöstem Enzym, über einen längeren Zeitraum erhöht.

DE 40 26 153 beschreibt die Herstellung eines Polyurethan-Kunststoffschaums, in dessen Poren ein Hydrogel eingelagert ist. An das aus Polysacchariden bestehende Hydrogel werden proteolytisch wirkende Enzyme wie zum Beispiel Trypsin, Gelatinase, Chymotrypsin und Kollagenase über eine Aktivierungsreaktion mit CDI oder dem Kopplungsreagenz Bromcyan gebunden. EP 0 236 610 beschreibt die Einarbeitung (Inkapsulierung) von oxidativ wirkenden Enzymen wie zum Beispiel Glucoseoxidase in ein Urethanpräpolymer. Das Enzym wird durch Kontakt mit Serum aktiviert und produziert oxidierend wirkende Substanzen wie Wasserstoffperoxid zur Bekämpfung von Bakterien in infizierten Wunden.

Nach DE 36 06 265 werden therapeutisch wirksame nicht-immobilisierte Enzyme zur Wundreinigung in eine Wundauflage auf Polysaccharidbasis eingearbeitet. Als Enzymträger werden Cellulose-Schwammstücke vorgeschlagen, die durch Tauchen und Tränken in eine Enzymlösung hergestellt werden. Nach Kontakt des Enzymträgers mit der Wunde werden die nicht-immobilisierten proteolytisch wirkenden Enzyme in die Wunde abgegeben.

Ein proteolytischer Wundverband als Trockenpuder oder Streupulver in Form von sphärischen Teilchen von 0,05 bis 0,5 mm auf Basis von Polysacchariden wie Dextran, Chitin und Chitosan, an denen eine Protease gebunden ist, wird in DE 34 44 746 beschrieben. Zur Aktivierung der Polysaccharidmatrix wurden Glutaraldehyd, Bromcyan, 2-Amino-4.6-dichlor-s-triazin und Einführen von Isothiocyanatgruppen mit Thiophosgen eingesetzt.

Seit Menschengedenken ist die Heilung von therapieresistenten Wunden eine große Herausforderung für die Medizin und Naturwissenschaften. Die heutigen Anforderungen an die Funktion von interaktiven Wundauflagen für chronische Wunden gehen zurück auf G. Winter (1962, Nature 193, 293) und sind jüngst von T. D. Turner neu formuliert worden (1994, Wound Rep. Reg. 2, 202). Im Vordergrund steht dabei die Schaffung eines feuchten Wundheilungsmilieus, das im Gegensatz zur traditionellen trockenen

Wundbehandlung mit zum Beispiel Mullkompressen den natürlichen Abläufen der Wundheilung physiologische und damit bessere Konditionen bietet.

Das Prinzip der feuchten Wundheilung kann derzeit als der Stand der Technik in der Therapie schwer oder nicht heilender Wunden angesehen werden. Die Wundauflage muß die Hauptmenge des Exsudates aufnehmen und gleichzeitig aber auf der Wunde selbst einen Flüssigkeitsfilm belassen, in dem die eigentliche feuchte Wundheilung stattfindet. Bei trockenen und schwachexsudierenden Wunden muß die Versorgung der Wunde mit ausreichend Feuchtigkeit erfolgen um eine Rehydrierung des dehydrierten Gewebes zu erreichen. In der auf diese Weise etablierten feuchten Wunde kommt es dann zur Proliferation von neuen Blutgefäßen und vermindertem Bakterienwachstum unter Einstellung eines geeigneten pH-Wertes. Erfüllt werden diese Anforderungen von Strukturen, wie beispielsweise Hydrogelen, Alginaten und Superabsorber enthaltenden Wundauflagen die einen Überschuß von Wundexsudat aufnehmen können.

Unter dem Begriff „Störfaktoren“ werden allgemein Stoffe oder Substanzen verstanden, die den Heilungsprozeß von Wunden verhindern oder verlangsamen und damit zur Ausbildung von chronischen Wunden führen. Dabei sind im Wundexsudat vorhandene suspendierte Zellen (zum Beispiel entzündliche Zellen wie Leukozyten und Makrophagen) und Zellfragmente oder gelöste Bestandteile wie Antigene, Radikale (wie zum Beispiel reaktive Sauerstoffspezies, ROS), Ionen (wie zum Beispiel Eisenionen), Proteine und Peptide eingeschlossen.

In der entzündlichen Phase der Wundheilung, die der Blutgerinnung und Blutplättchen-Aggregation nach Verletzung und Trauma folgt, wandern bevorzugt Neutrophile und Monozyten in das geschädigte Gewebe ein. Dort beginnen sie mit der Phagozytose von Keimen und dem Abbau von zerstörtem Gewebe und fremden Antigenen. Durch chemische Botenstoffe und Mikroorganismen aktiviert und stimuliert, kommt es zu einer stark erhöhten Produktion von ROS, auch „oxidative burst“ genannt. Diese ROS werden in Granula gespeichert und bei weiterer Stimulierung in hohen lokalen Konzentrationen in das extrazelluläre Gewebe zur Bekämpfung von Mikroorganismen freigegeben.

In der normal verlaufenden Wundheilung kommt es nach erfolgreicher Beseitigung der immunologischen Reize zur Beendigung der entzündlichen Phase, und der Wiederaufbau des Gewebes kann beginnen. Bleiben jedoch diese Reize bestehen, wandern weitere Leukozyten in das Gewebe nach und werden wiederum aktiviert, was zu einer dauerhaft entzündeten oder chronischen Wunde führt. Die Ausschüttung von ROS (O. Senel et al., 1997, *Annals of Plastic Surgery*, 39, 516) und proteolytischen Enzymen führt zu einer Schädigung des Gewebes (Halliwell & Gutteridge, 1989, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2. Auflage, Clarendon Press, Oxford).

10 Es ist erforderlich, daß das an die Polyurethanele (PU-Gele) gebundene Enzym eine hohe Spezifität für das in der Wundflüssigkeit vorhandene Substrat besitzt. Durch diese selektive Entfernung beziehungsweise Eliminierung des Substrats wird der Heilungsprozeß chronischer, d. h. schwer oder nicht heilender Wunden verbessert beziehungsweise eingeleitet.

15

Im Falle eines enzymdotierten PU-Gels, das aus den Enzymen SOD und/oder Katalase oder aus einer Mischung der beiden Enzyme besteht, ist ein selektives Entfernen von ROS aus der Wundflüssigkeit möglich.

Das Enzym SOD katalysiert die Dismutationsreaktion von reaktivem Superoxid in die weniger toxischen Zwischenstufen Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Es tritt als dimere oder tetramere Form auf. Die verschiedenen Enzyme mit Molekulargewichten von 32.000 bis 56.000 Da haben Metall-Ionen wie Kupfer und Zink (Cu-Zn-SOD), Mangan (Mn-SOD) oder Eisen (Fe-SOD) als Co-Faktoren im katalytischen Zentrum. Das ubiquitäre Enzym SOD spielt die Hauptrolle in der zellulären Verteidigung gegen die sauerstoffvermittelte Toxizität von ROS und bei der Regulierung der intrazellulären Sauerstoffkonzentration (Fridovich, 1995, *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97). Das durch die Reaktion der SOD gebildete Wasserstoffperoxid wird anschließend durch das in aeroben Organismen ubiquitäre Redoxenzym Katalase in einem mehrstufigen katalytischen Zyklus in die nichttoxischen Moleküle Wasser und Sauerstoff umgewandelt (Gouet et al., 1996, *Nature Structural Biology*, 3, 951). Außer Katalase sind auch die Enzyme Gluthathion-Peroxidase und Myeloperoxidase befähigt, Wasserstoffperoxid abzubauen.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine wasserunlösliche, wasseraufnehmende Polyurethanmatrix nach einem neuen Verfahren zu fertigen, die für medizinische Zwecke einsetzbar sind und sich in besonderem Maße zur Förderung der Heilung von chronischen Wunden eignen.

5

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man bei der Herstellung der Polyurethanmatrix Enzyme immobilisiert, die mit den in Wundflüssigkeiten von chronischen Wunden vorhandenen ROS wechselwirken, d.h. mit Faktoren, die den Wundheilungsprozess behindern, wobei man diese zusätzlichen Substanzen kovalent an die PU-Matrix bindet.

10

Dementsprechend beschreibt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen, wobei die Polyurethanmatrix in einem Lösungsmittelgemisch vorgelegt wird, wobei das Lösungsmittelgemisch zumindest zu 80% unpolare Lösungsmittel enthält (insbesondere zwischen 80% und 95%), in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz befindet, so daß die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.

15

20

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform ist die Polyurethanmatrix ein Polyurethangel oder ein daraus hergestellter Polyurethanschäum oder eine daraus hergestellte Polyurethan-Folie.

25

Die im wesentlichen wasserfreien und zum Teil selbstklebenden PU-Gelmassen sind zum Beispiel bekannt aus DE 196 18 825, EP 0 057 839, EP 0 147 588 sowie DE 43 08 347. Die dort beschriebenen Gele setzen sich zusammen aus Polyhydroxyverbindungen und aromatischen oder aliphatischen Polyisocyanaten. Bevorzugt wird ein Polyurethangel bestehend aus Levagel (Copolymer aus Propylenoxid und Ethylenoxid mit einem Molekulargewicht von ca. 6400 g/mol, Bayer, Leverkusen) und Hexamethylendiisocyanat mit einem NCO/OH-Verhältnis von 0,3 bis 0,7 verwendet. Da nicht alle OH-Funktionalitäten während der Vernetzungsreaktion abreagieren, stehen für die kovalente Kopplung an eine PU-Matrix zur Immobilisierung von Substanzen in der hier beschriebenen Art und Weise freie OH-Funktionalitäten zur Verfügung.

30

Für den Einsatz der erfindungsgemäßen Polyurethanprodukte als Wundauflage ist es von Vorteil, wenn die immobilisierten Substanzen direkt an der PU-Oberfläche angebunden sind. Für die Aktivierungsreaktion sind Lösungsmittel erforderlich, die das Aktivierungsreagenz lösen. In Aceton, Dioxan, Diethylether, Dimethylglycol oder
5 Dichlormethan sowie Alkoholen und in Mischungen der genannten Lösungsmittel quillt das Polyurethan so stark, daß es bereits bei geringen mechanischen Belastungen zerreißt. Außerdem werden niedermolekulare Bestandteile des Polyurethangels aus der Gelmatrix herausgelöst. Dadurch gehen einerseits gerade die Bestandteile verloren, die über viele freie OH-Gruppen für die Aktivierung und Kopplung verfügen
10 und andererseits werden die mechanischen Eigenschaften des Polyurethangels verändert. Des weiteren können bei einer starken Quellung der PU-Matrix die Substanzen zum Teil auch im Inneren der PU-Matrix immobilisiert werden und haben damit für die Anwendung keinen Nutzen.

15 Das Lösungsmittelgemisch besteht insbesondere aus ungefähr 80% bis 95% der unpolaren Lösungsmittel und aus ungefähr 20% bis 5% der polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel, insbesondere aus 90% der unpolaren Lösungsmittel und 10% der polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel.

20 Die polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel sind insbesondere gewählt aus der Gruppe Aceton, Ether, Ketone, Ester, Amide, beispielsweise Methyl-tert.butylketon, Dioxan, Diethylether, Dimethylglycol, Dichlormethan, Ethylacetat, Dimethylformamid. Als unpolare Lösungsmittel kommen vorzugsweise Hexan, Heptan und/oder Petrolether (zum Beispiel Petrolether 35/60) zum Einsatz.

25 In unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan, Heptan oder Petrolether findet kaum eine Quellung der Polyurethanmatrix statt. In diesen Lösungsmitteln sind die Aktivierungsreagenzien, wie zum Beispiel CDI oder CDT nahezu unlöslich. Bei der Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus 80% bis 95% der unpolaren Lösungsmittel, wie Hexan, Heptan oder Petrolether, und 20% bis 5% der polaren bis leicht polaren organischen
30 Lösungsmittel werden die Quellung und damit die genannten Nachteile stark unterdrückt, und es kann sich dennoch genug Aktivierungsreagenz lösen.

In Wasser zeigt das Polyurethangel ebenfalls eine nur geringe Quellneigung, wobei die generelle Verwendung von Wasser als Lösungsmittel für die Aktivierung jedoch deshalb ausscheidet, weil sich CDI und CDT in Wasser zersetzen. Zur Lösung dieses Problems kann als Alternative das Aktivierungsreagenz Thiocarbonyldiimidazol (TCDI) eingesetzt werden.

In dieser alternativen Lösungsmöglichkeit wird ein Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen beansprucht, wobei die Polyurethanmatrix in Wasser als Lösungsmittel für das TCDI (ca. 1 Gew.-%) vorgelegt wird, in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz befindet, so daß die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsvariante ist das Biomolekül aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Chelatoren, Enzyminhibitoren, Enzymen, Peptiden und anderen Proteinen ausgewählt.

Besonders vorteilhaft läßt sich die erfindungsgemäß hergestellte Polyurethanmatrix zur Herstellung von Wundauflagen einsetzen.

Das an die Polyurethanmatrix kovalent gebundene Biomolekül sollte mit in Wundexsudat vorhandenen Störfaktoren, die den Wundheilungsprozeß behindern, wechselwirken, wobei die Störfaktoren aus der Gruppe bestehend aus suspendierten Zellen und Zellfragmenten sowie gelösten Bestandteilen wie Antigenen, Radikale, Ionen, Proteine, Peptide, Lipide und freie Fettsäuren ausgewählt sind, wobei die Wechselwirkung ein Binden, Komplexieren, Chelatisieren des Störfaktors oder eine chemische Reaktion mit dem Störfaktor umfaßt und wobei die Substanzen kovalent an ein Trägermaterial gebunden sind.

Beispielsweise ist es möglich, mit den enzymimmobilisierten Polyurethangeln toxische ROS in der Wundflüssigkeit von chronischen Wunden unschädlich zu machen.

Die Wundauflage ist besonders aus der Gruppe bestehend aus Verbänden, Verbandmull, Binden, Kompressen, Watten, Pflaster, Folien, Filmen, Hydrokolloidverbänden, Gelen und dergleichen ausgewählt.

- 5 Schließlich sollte die Wundauflage in der Lage sein, Feuchtigkeit aufzunehmen.

Vorzugsweise sind die Störfaktoren Eisenionen und die mit den Störfaktoren wechselwirkende Substanz ein Chelator, wobei dieser nun wieder insbesondere aus der Gruppe von immobilisierbaren Komplexbildnern wie zum Beispiel Desferrioxamin ausgewählt ist.

10

Weiter vorzugsweise sind die Störfaktoren reaktive Sauerstoffradikale und die mit den Störfaktoren wechselwirkende Substanz ein Radikalfänger, wobei dieser insbesondere aus der Gruppe bestehend aus Superoxiddismutase, Katalase, Gluthathion-Peroxidase, Myeloperoxidase und Enzym-Mimics oder einer anderen Kombination davon ausgewählt

15 ist.

Weiter vorzugsweise sind der Störfaktor eine Protease und die mit dem Störfaktor wechselwirkende Substanz ein Protease-Inhibitor, wobei dieser insbesondere aus der Gruppe bestehend aus natürlichen proteinogenen Protease-Inhibitoren aus der Klasse der tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases wie zum Beispiel Alpha-2-Antiplasmin, Alpha-2-Makroglobulin, Alpha-1-Antichymotrypsin, Sojabohnen-Trypsininhibitor und Alpha-1-Protease-Inhibitor ausgewählt ist.

20

Dann können die Störfaktoren Eisenionen sein und die mit den Störfaktoren wechselwirkende Substanz Desferrioxamin, alternativ reaktive Sauerstoffradikale und die mit den Störfaktoren wechselwirkende Substanz ein Radikalfänger, wobei der Radikalfänger aus der Gruppe bestehend aus Superoxiddismutase, Katalase, Gluthathion-Peroxidase, Myeloperoxidase und Enzym-Mimics oder einer Kombination davon ausgewählt ist.

25

Weiterhin kann der Störfaktor eine Protease sein und die mit dem Störfaktor wechselwirkende Substanz ein Protease-Inhibitor, wobei der Protease-Inhibitor aus der Gruppe bestehend aus natürlichen proteinogenen Protease-Inhibitoren aus der Klasse der Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases, Aprotinin, Alpha-2-Antiplas-

30

min, Alpha-2-Makroglobulin, Alpha-1-Antichymotrypsin, Sojabohnen-Trypsininhibitor und Alpha-1-Protease Inhibitor ausgewählt ist.

5 Weiterhin wird erfindungsgemäß beschrieben, daß eine Kopplung auch über Spacer-moleküle, das sind α,ω -difunktionelle Substanzen, wie beispielsweise 1,6-Diaminohexan oder 6-Aminohexancarbonsäure, an eine PU-Matrix möglich ist.

10 Durch die vorliegende Erfindung werden erstmals nach einem neuartigen Verfahren hergestellte PU-Gelmatrices als Wundauflage zur Verbesserung des Heilungsverlaufs von chronischen Wunden zur Verfügung gestellt.

15 Die aktiven Biomoleküle werden beim Entfernen der PU-Matrix ebenfalls mit entfernt, ohne daß sie in der Wunde beziehungsweise in der Wundflüssigkeit verbleiben. Die zur Wechselwirkung verwendeten, kovalent in die PU-Matrix eingebundenen Bio-moleküle werden somit nur vorübergehend in die Wunde eingebracht und werden, nachdem sie ihre bestimmungsgemäße Aufgabe verrichtet haben (d. h., die oben genannten Wechselwirkungen eingegangen sind), wieder aus dem Wundbereich entfernt. Durch die selektive Beseitigung beziehungsweise Eliminierung der toxischen
20 ROS, das proteolytische Auflösen von totem Gewebe und das Abtöten von Mikroorganismen wird der Heilungsprozeß chronischer, d. h. schwer oder nicht heilender Wunden verbessert beziehungsweise eingeleitet.

25 In der chronischen Wunde findet man eine deutlich erhöhte Proteaseaktivität (Weck-roth et al., 1996, J. Invest. Dermatol., 106, 1119; Grinell & Zhu, 1996, J. Invest. Dermatol. 106, 335) im Vergleich zur akuten Wunde. Enzyme wie zum Beispiel SOD und Katalase, die durch ihre schützende Wirkung wundheilungsfördernd wirken, würden dadurch proteolytisch abgebaut und somit unwirksam. Ein Polyurethangel, an das solche Enzyme kovalent gebunden sind, wirkt als Schutzschild und kann den Angriff
30 von Proteasen verhindern, wie mit Polyethylenglykol modifizierten gelösten Enzymen gezeigt wurde (J. S. Beckman et al., 1988, J. Biol. Chem., 14, 6884; Y. Inada et al., 1995, Tibtech, 13, 86).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es somit nicht nur, möglichst ein feuchtes Wundmilieu zu generieren, um den Heilungsprozeß chronischer Wunden zu verbessern, sondern der Heilungsprozeß kann auch erfindungsgemäß dadurch weiter beschleunigt werden, zum Beispiel durch die oben genannten Umwandlungsprozesse.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert, ohne diese damit unnötig einschränken zu wollen.

Beispiele

Für die folgenden Beispiele wurden Polyurethanele eingesetzt, die aus einer Polyolkomponente (Levigel, Bayer, Leverkusen) und einer Diisocyanatkomponente wie beispielsweise Hexamethyldiisocyanat (Bayer, Leverkusen) mit einem NCO/OH-Verhältnis von 0,3 bis 0,7 bestanden.

Beispiel 1

Herstellung einer mit N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) oder N,N'-Carbonylditriazol (CDT) aktivierten Polyurethanmatrix

Die Experimente zur Herstellung einer CDI-aktivierten beziehungsweise CDT-aktivierten Polyurethanmatrix wurden wie folgt durchgeführt.

10 identische Polyurethanstücke (1,2 mm Dicke, 15 mm Durchmesser, 275 mg/Stück) wurden in einem Gemisch aus 90 ml trockenem Hexan (oder Petrolether 35/60) und 10 ml trockenem Aceton mit 1 g (6,25 mmol) CDI (Sigma, Steinheim) oder 1 g (6,1 mmol) CDT (Sigma, Steinheim) aktiviert.

In beiden Fällen lief die Reaktion in einem 250 ml Rundkolben eine Stunde lang bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß und mäßigem Rühren. Danach wurde das Lösungsmittel abdekantiert und die CDI-aktivierten beziehungsweise CDT-aktivierten Polyurethanstücke auf silikonisiertem Trennpapier an der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Beispiel 2

Herstellung einer mit Thiocarbonyldiimidazol (TCDI) aktivierten Polyurethanmatrix

- 5 Es wurden 10 identische Polyurethanstücke, wie in Beispiel 1 beschrieben, in 100 ml dest. Wasser mit 1 g Thiocarbonyldiimidazol (TCDI, Fluka, 5,6 mmol) aktiviert. Die Reaktion lief zwei Stunden bei 32 °C und mäßigem Rühren in einem 250 ml Rundkolben.
- 10 Danach wurde das Wasser abdekantiert, und die PU-Stücke wurden, nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser, auf silikonisiertem Trennpapier getrocknet.

Beispiel 3

Kopplung der Spacermoleküle 6-Aminohexansäure oder 1,6-Diaminohexan an eine Polyurethanmatrix

- 15 10 identische Polyurethanstücke wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, aktiviert und anschließend in 20 ml NaHCO₃-Puffer (100 mM, pH 8.0), im weiteren als Kopplungspuffer bezeichnet, gelegt. Dazu wurden entweder 500 mg (3,81 mmol) 6-Aminohexansäure analytical grade (Serva, Heidelberg) oder 500 mg (4,3 mmol) 1,6-Diaminohexan (Fluka, Buchs) gegeben.
- 20

- Die Reaktion lief über 18 Stunden bei Raumtemperatur, wobei intensiv gerührt wurde. Danach wurde die Pufferlösung abgegossen. Die Polyurethanstücke wurden dann insgesamt je dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um Reste der nicht gekoppelten
- 25 6-Aminohexansäure oder des 1,6-Diaminohexans zu entfernen. Anschließend wurden die mit 6-Aminocarbonsäure beziehungsweise 1,6-Diaminohexan gekoppelten Polyurethanstücke an der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Beispiel 4

- 30 **Kopplung von Desferoxamin (DFO) an eine aktivierte Polyurethanmatrix**

10 identische Polyurethanstücke, die wie in den Beispielen 1 oder 2 angegeben aktiviert wurden, wurden in 20 ml Kopplungspuffer gelegt. Anschließend wurden je 200 mg DFO (0,30 mmol) (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Die Kopplungsreaktion lief unter intensi-

5 vem Rühren über 18 Stunden bei Raumtemperatur ab. Danach wurde die Pufferlösung
abgegossen und mehrfach durch destilliertes Wasser ersetzt, um unspezifisch gebun-
denes DFO aus dem Polymer herauszuwaschen.

- 5 Der Nachweis des Kopplungsproduktes aus Polyurethan und DFO erfolgte mit einer
Farbreaktion, die zugleich einen Funktionalitäts-Assay darstellt: Durch Komplexbildung
von Eisen mit gelöstem DFO entsteht im Verhältnis 1:1 der intensiv orange gefärbte
DFO-Eisen-III-Komplex Ferrioxamin (Hallaway et al., 1989, PNAS, 86, 10108). Die DFO-
gekoppelte Polyurethanmatrix wurde 2-3 Stunden mit 200 µM Eisensulfat (pH 5.0) unter
10 leichtem Rühren inkubiert, wobei es zu einer braunroten Färbung der Polyurethanmatrix
kam, die die Immobilisierung von DFO beweist. Abschließend wurde die Polyurethan-
matrix mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen, um nichtgebundenes Eisen zu
entfernen. Nach dem Stehenlassen über Nacht kam es zu einer Farbintensivierung der
Muster. Eine Kontrolle mit nicht aktiviertem Polyurethan führte zu keiner Anfärbung mit
15 Eisensulfatlösung.

Beispiel 5

Kopplung von bovinem Serumalbumin (BSA) an eine aktivierte Polyurethanmatrix

- 20 10 identische Polyurethanstücke wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, aktiviert und
danach in 20 ml Kopplungspuffer gelegt. Dazu gibt man 200 mg BSA (Serva, rezeptor
grade, lyophilisiert, 2,985 µmol).

- Die Reaktion lief über 18 Stunden bei Raumtemperatur, wobei intensiv gerührt wurde.
25 Danach wurde die Pufferlösung abdekantiert, und die Polyurethanstücke wurden insge-
samt dreimal gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein von der Polyurethan-
matrix zu lösen, zuerst mit einer 0,1 %igen wässrigen Polyoxyethylensorbitanmono-
laurat-Lösung (Tween-20) von Fluka (Buchs), danach mit gesättigter NaCl-Lösung
(Merck, Darmstadt) und zuletzt mit destilliertem Wasser.

30

Als Nachweis des an Polyurethan immobilisierten BSA wurde eine Färbung mit dem
Fluoreszenzfarbstoff Fluorescamin (Fluram®) von Fluka (Buchs) durchgeführt.

15 mg des Farbstoffs wurden in 10 ml trockenem Aceton aufgelöst. Zu einem BSA-gekoppelten Polyurethanstück, das in 1 ml eines NaHCO_3 -Puffers (100 mM, pH = 8.0) eingelegt war, wurden 250 μl der Fluorescaminlösung gegeben. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop Fluovert FS (Leica, Bensheim) bei einer Anregungsfrequenz von 390 nm und einer Emissionsfrequenz von 475 nm beobachtet.

Der Farbstoff reagierte spezifisch mit primären Aminogruppen des Proteins (S. Udenfried et. al., 1972, Science 178, 871), wobei die Hydrolyseprodukte und der Farbstoff selbst nicht fluoreszierend waren. Die Zersetzung des Farbstoffes sowie die Bildung des fluoreszierenden Produktes erfolgten in wässriger Lösung sehr schnell, so daß keine Störungen durch Nebenreaktionen auftraten.

An die Polyurethanmatrix immobilisierte Proteine können mit Trinitrobenzolsulfonsäure angefärbt werden (P. Cuatrecasas, C.B. Anfinsen, Affinity Chromatographie, Methods of Enzymologie, 1971, 22, S.363). Zu einem Polyurethanstück mit immobilisiertem BSA in 30 ml destilliertem Wasser wurden 500 μl einer 5%igen wässrigen TNBS-Lösung gegeben. Die Lösung wurde unter Rühren eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Danach wurde unspezifisch gebundener Farbstoff mit destilliertem Wasser von der Polyurethanmatrix entfernt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Wasser farblos blieb. Es konnte gezeigt werden, daß die mit Enzym gekoppelte Polyurethanmatrix im Vergleich zu einer unbehandelten Polyurethanmatrix eine orange Färbung der Polyurethanmatrix aufwies.

Beispiel 6

25 Kopplung von Superoxiddismutase (SOD) an eine aktivierte Polyurethanmatrix

Als Enzym wurde Hefe-SOD, Dismutin[®] BT, (Pentapharm, Basel) eingesetzt. Vor dem Einsatz in die Kopplungsreaktion mit der aktivierten Polyurethanmatrix wurde die SOD-Lösung umgepuffert, um Stabilisatoren wie zum Beispiel Parabene abzutrennen. Dazu wurden 2 ml der SOD-Lösung in einen Mikrokonzentrator (Amincon, Witten) mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa pipettiert. Dann wurde in einer Zentrifuge (Hettich, Modell EBA 3S, Tuttlingen) bei einer Drehzahl von 3000 rpm 30 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Überstand mit 1 ml des Kopplungspuffers oder Wasser aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt und anschließend wurde die

SOD-Lösung in einer Konzentration von 1,5 mg/ml (1 : 10 Verdünnung) für die Kopplung mit dem aktivierten Polyurethan eingesetzt.

Die Kopplungsreaktion wurde mit 10 identischen Polyurethanstücken durchgeführt, wobei die Aktivierungsreaktionen aus den Beispielen 1 angewandt wurden. Kopplungsbedingungen und Aufarbeitung der Produkte sind identisch wie in Beispiel 5 für die Kopplung von BSA an eine Polyurethanmatrix beschrieben.

Der Nachweis der Kopplung der Hefe-SOD an die Polyurethan-Matrix wurde mit einem ELISA geführt. Zunächst wurde die mit SOD-immobilisierte PU-Gelmatrix mit einem humanen Anti-(Cu/Zn)-Superoxiddismutase-Antikörper aus Schaf (Calbiochem, Nr. 574597) in einer Verdünnung von 1: 500 bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer 24-Well-Zellkulturplatte (Greiner, Frickenhausen) inkubiert. An diesen primären anti-(Cu/Zn)-SOD-Antikörper band ein sekundärer Antikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist. Das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) wurde durch die Peroxidase umgesetzt, woraus eine Farbreaktion resultierte, die spektroskopisch quantifiziert werden kann. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion wurden je 150 µl der Lösungen in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatten transferiert und mit einem ELISA-Reader MR 5000 (Dynex, Denkendorf) photometrisch bei 450 nm bestimmt bei einer Referenz von 550 nm.

Für die Positivkontrolle wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Rundboden (Greiner, Frickenhausen) mit 20 µg/ml Hefe-SOD Dismutin® BT (Pentapharm, Basel) in je 1 ml Puffer (50 mM NaHCO₃, pH 9.4) pro Well beschichtet und über Nacht im Kühlschrank bei 4° C inkubiert. Anschließend wurden mit je 1 ml pro Well an 20%igem Schweine-Serum (Gibco, Karlsruhe) für eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungen blockiert. Nach 4 mal Waschen mit PBS-Puffer (135 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM KH₂PO₄, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) mit 0,01% Tween-20 (Merck, Darmstadt) wurde der primäre Anti-(Cu/Zn)-Superoxiddismutase-Antikörper aus Schaf in einer Verdünnung von 1: 500 in Verdünnungspuffer (0,5% Tween-20, 2% Schweine-Serum in PBS-Puffer) mit je 1 ml pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde wiederum 4 mal mit Waschpuffer gewaschen und Peroxidase-konjugiertes Anti-Schaf IgG (Dianova, Nr. 713-035-147) als sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 je 1 ml pro Well eine Stunde bei Raum-

temperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiterem 4-maligen Waschen mit Waschpuffer wurde die TMB-Substratlösung durch Auflösen von (10 mg/mL DMSO) und anschließender Zugabe von 70 µl TMB-Stammlösung zu 10 ml Acetatpuffer hergestellt. Pro Well wurden 1 ml der TMB-Lösung zugegeben und mit 13 µl H₂O₂ (3%) gestartet und für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach 20 min wurde die entstehende Farbreaktion durch Zugabe von 140 µl pro Well 2M H₂SO₄ abgestoppt und mit einem ELISA-Reader MR 5000 photometrisch bei 450 nm bestimmt bei einer Referenz von 550 nm.

10

Beispiel 7

Kopplung von Hefe-SOD an eine Polyurethanmatrix über die Spacer 6-Aminohexansäure und 1,6-Diaminohexan

Polyurethanstücke, vorbehandelt mit einem 6-Aminohexansäure-Spacer oder 1,6-Diaminohexan-Spacer, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden in 20 ml destilliertem Wasser (pH-Wert mit 0,02 M Salzsäure auf 4,5 eingestellt) eingelegt. Unter leichtem Rühren wurden dazu 500 mg (2,61 mmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) zugesetzt und nach 1 Minute 10 ml einer SOD Lösung (1,5 mg/ml) hinzugegeben. Die Kopplungsreaktion der Hefe-SOD an die Polyurethanmatrix lief für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren. Bei Aufarbeitung und Reinigung des Polymers wurde wie unter Kopplung von bovinem Serumalbumin (BSA) an eine aktivierte Polyurethanmatrix (Beispiel 5) beschrieben, verfahren. Als Nachweis der Kopplungsreaktion wurde ein ELISA durchgeführt (siehe Beispiel 6).

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen, wobei die Polyurethanmatrix in einem Lösungsmittelgemisch vorgelegt wird, wobei das Lösungsmittelgemisch zumindest zu 80% unpolare Lösungsmittel enthält, in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz befindet, so daß die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polyurethanmatrix ein Polyurethangel oder ein daraus hergestellter Polyurethanschaum oder eine daraus hergestellte Polyurethan-Folie ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lösungsmittelgemisch aus ungefähr 80% bis 95% der unpolaren Lösungsmittel und aus ungefähr 20% bis 5% der polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel besteht, insbesondere aus 90% der unpolaren Lösungsmittel und 10 % der polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel, wobei die polaren bis leicht polaren organischen Lösungsmittel insbesondere gewählt sind aus der Gruppe Aceton, Ether, Ketone, Ester, Amide.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das unpolare Lösungsmittel Hexan, Heptan und/oder Petrolether ist.
5. Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen, wobei die Polyurethanmatrix in Wasser als Lösungsmittel vorgelegt wird, in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz Thiocarbonyldiimidazol befindet, so daß die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Chelatoren, Enzyminhibitoren, Enzymen, Peptiden und anderen Proteinen ausgewählt ist.
- 5 7. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche hergestellten Polyurethanmatrix zur Herstellung von Wundauflagen.
8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das in der Polyurethanmatrix kovalent gebundene Biomolekül mit in Wundexsudat vorhandenen Störfaktoren, die den Wundheilungsprozeß behindern, wechsel-
10 wirkt, wobei die Störfaktoren aus der Gruppe bestehend aus suspendierten Zellen und Zellfragmenten sowie gelösten Bestandteilen wie Antigene, Radikale, Ionen, Proteine, Peptide, Lipide und freie Fettsäuren ausgewählt sind, wobei die Wechselwirkung ein Binden, Komplexieren, Chelatisieren des Störfaktors oder eine chemi-
15 sche Reaktion mit dem Störfaktor umfaßt und wobei die Substanzen kovalent an ein Trägermaterial gebunden sind.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wundauflage aus der Gruppe bestehend aus Verbänden, Verbandmull,
20 Binden, Kompressen, Watten, Pflastern, Folien, Filmen, Hydrokolloidverbänden, Gelen und dergleichen ausgewählt ist.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/66092 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 9/70,**
47/34

D-38678 Clausthal-Zellerfeld (DE). **SCHAUMANN,**
Ernst [DE/DE]; Kurt-Küchler-Strasse 39, D-22609 Ham-
burg (DE). **SCHINK, Michael** [DE/DE]; Falckweg 3,
D-22605 Hamburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/03830**

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. April 2000 (27.04.2000)

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BEIERSDORF AG;** Unna-
strasse 48, D-20245 Hamburg (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): **AU, US.**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 20 262.1 4. Mai 1999 (04.05.1999) **DE**

Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **BEIERSDORF AG** [DE/DE]; Unnastrasse 48,
D-20245 Hamburg (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: **31. Mai 2001**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ETTNER, Norbert**
[DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 21, D-86551 Aichach
(DE). **MAHLER, Thomas** [DE/DE]; Rollplatz 3B,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR PRODUCING A POLYURETHANE MATRIX WITH COVALENTLY IMMOBILISED BIOMOLECULES**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER POLYURETHANMATRIX MIT KOVALENT IMMOBILI- SIERTEN BIOMOLEKÜLEN**

(57) Abstract: According to the inventive method for producing a polyurethane matrix with covalently immobilised biomolecules, the polyurethane matrix is presented in a solvent mixture containing an at least 80 % non polar solvent in which the polyurethane matrix does not swell or swells only slightly and in which the activating reagent is contained, so that the subsequent immobilisation of the biomolecule preferably takes place on the surface of the polyurethane matrix or on layers near to the surface.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung einer Polyurethanmatrix mit kovalent immobilisierten Biomolekülen, wobei die Polyurethanmatrix in einem Lösungsmittelgemisch vorgelegt wird, wobei das Lösungsmittelgemisch zumindest zu 80 % unpolare Lösungsmittel enthält, in dem die Polyurethanmatrix gar nicht oder nur schwach quillt und in dem sich das Aktivierungsreagenz befindet, so dass die anschließende Immobilisierung des Biomoleküls bevorzugt an der Oberfläche der Polyurethanmatrix oder an oberflächennahen Schichten stattfindet.

WO 00/66092 A3



1

2

3

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interns Application No
PCT/E 00/03830

Copy

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/70 A61K47/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 250 267 A (HARTDEGEN FRANK J ET AL) 10 February 1981 (1981-02-10) column 3, line 64 - column 4, line 28 column 30, line 30 - line 46; example 22 ---	1-9
A	US 4 098 645 A (HARTDEGEN FRANK JOSEPH ET AL) 4 July 1978 (1978-07-04) claim 1 ---	1-9
A	US 5 134 072 A (EICKEN ULRICH ET AL) 28 July 1992 (1992-07-28) column 1, line 53 - line 68 claims 1-13 ---	1-9
A	DE 43 08 445 A (BEIERSDORF AG) 22 September 1994 (1994-09-22) page 2, line 3 - line 5 claim 1 -----	1-9

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2000

Date of mailing of the international search report

11/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/EP 00/03830

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 4250267	A	10-02-1981	NONE		
US 4098645	A	04-07-1978	AT	347028 B	11-12-1978
			AT	280376 A	15-04-1978
			CA	1076027 A	22-04-1980
			CH	639673 A	30-11-1983
			DE	2612138 A	30-12-1976
			FR	2314194 A	07-01-1977
			GB	1541100 A	21-02-1979
			JP	1243714 C	14-12-1984
			JP	51150600 A	24-12-1976
			JP	59017733 B	23-04-1984
			MX	4074 E	02-12-1981
			NL	7603951 A	14-12-1976
US 5134072	A	28-07-1992	DE	3705687 A	01-09-1988
			AT	63945 T	15-06-1991
			DE	3862949 D	04-07-1991
			EP	0280212 A	31-08-1988
			GR	3002028 T	30-12-1992
			JP	1670182 C	12-06-1992
			JP	3036511 B	31-05-1991
			JP	63226283 A	20-09-1988
DE 4308445	A	22-09-1994	AU	692424 B	11-06-1998
			AU	4820193 A	26-04-1994
			DE	59309311 D	25-02-1999
			WO	9407935 A	14-04-1994
			EP	0665856 A	09-08-1995
			ES	2129082 T	01-06-1999
			JP	8501819 T	27-02-1996
			US	5844013 A	01-12-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K9/70 A61K47/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 250 267 A (HARTDEGEN FRANK J ET AL) 10. Februar 1981 (1981-02-10) Spalte 3, Zeile 64 - Spalte 4, Zeile 28 Spalte 30, Zeile 30 - Zeile 46; Beispiel 22 ---	1-9
A	US 4 098 645 A (HARTDEGEN FRANK JOSEPH ET AL) 4. Juli 1978 (1978-07-04) Anspruch 1 ---	1-9
A	US 5 134 072 A (EICKEN ULRICH ET AL) 28. Juli 1992 (1992-07-28) Spalte 1, Zeile 53 - Zeile 68 Ansprüche 1-13 ---	1-9
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Muller, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 08 445 A (BEIERSDORF AG) 22. September 1994 (1994-09-22) Seite 2, Zeile 3 - Zeile 5 Anspruch 1 -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03830

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4250267 A	10-02-1981	KEINE	
US 4098645 A	04-07-1978	AT 347028 B	11-12-1978
		AT 280376 A	15-04-1978
		CA 1076027 A	22-04-1980
		CH 639673 A	30-11-1983
		DE 2612138 A	30-12-1976
		FR 2314194 A	07-01-1977
		GB 1541100 A	21-02-1979
		JP 1243714 C	14-12-1984
		JP 51150600 A	24-12-1976
		JP 59017733 B	23-04-1984
		MX 4074 E	02-12-1981
		NL 7603951 A	14-12-1976
US 5134072 A	28-07-1992	DE 3705687 A	01-09-1988
		AT 63945 T	15-06-1991
		DE 3862949 D	04-07-1991
		EP 0280212 A	31-08-1988
		GR 3002028 T	30-12-1992
		JP 1670182 C	12-06-1992
		JP 3036511 B	31-05-1991
		JP 63226283 A	20-09-1988
DE 4308445 A	22-09-1994	AU 692424 B	11-06-1998
		AU 4820193 A	26-04-1994
		DE 59309311 D	25-02-1999
		WO 9407935 A	14-04-1994
		EP 0665856 A	09-08-1995
		ES 2129082 T	01-06-1999
		JP 8501819 T	27-02-1996
		US 5844013 A	01-12-1998

